

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola
Kísérletes Növénybiológia doktori program

Bohus Veronika

Ultra tiszta vízű ipari hűtővízrendszer mikrobióta- vizsgálata klasszikus és molekuláris módszerekkel

– doktori értekezés tézisei –

Témavezető:

Dr. Tóth Erika

egyetemi adjunktus

(ELTE Biológiai Intézet Mikrobiológiai Tanszék)

A Biológia Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Erdei Anna

tanszékvezető egyetemi tanár

(ELTE Biológiai Intézet Immunológiai Tanszék)

A Kísérletes Növénybiológia doktori program vezetője:

Prof. Dr. Szigeti Zoltán

tanszékvezető egyetemi tanár

(ELTE Biológiai Intézet Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék)



Készült az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszékén 2011-ben.



BEVEZETÉS

Számos ipari létesítményben alkalmaznak nagy tisztaságú vizet (UPW- ultra pure water, ultra tiszta víz) alapanyagként, nyersanyagként vagy hűtővízként. Ez rendkívül tápanyagszegény, alacsony ozmotikus koncentrációval jellemezhető közeget jelent, mikrobiális szennyezettsége mégis jelentős lehet. A mikroorganizmusok az ipari rendszereket alkotó vezetékek belső felületén megtapadva biofilmeket képezhetnek, melyek káros hatással lehetnek az adott ipari rendszerre: nehezítik a hőátadást és a víz áramlását, továbbá teret adnak a mikróbák által kiváltott és befolyásolt korrózió, azaz MIC (microbially influenced corrosion) fellépésének. Mindez a hatékonyság csökkenésében, az üzemeltetési és karbantartási költségek növekedésében érezetheti hatását. A mikroorganizmusok többféle szerepet játszhatnak fémfelületek korrozív károsításában: közvetlenül befolyásolhatják az anódos és katódos reakciókat, anyagcseretermékeik megbonthatják a passzív felületi fémoxid filmet, vagy korrozív környezetet alakíthatnak ki, lebonthatják a korróziós gátló anyagokat (védőfesték, védőbevonat). Még a korróziónak ellenálló ötvözetek is szenvednek a mikrobiálisan előidézett korróziótól ultra tiszta vizek hűtött, rozsdamentes acélból készült csöveinek pontkorrózióját is leírták.

Egy magyarországi erőmű ultra tiszta vízü hűtőrendszerében üzemeltetési problémák jelentkeztek: a vezetékek bélését alkotó gumi elvékonyodott, a folyadéktérrel érintkező felületeken biológiai romlás (biofouling) és korróziós jelenségek (MIC léptek fel, a víz tisztítására alkalmazott ioncserélő gyanták hatékonysága csökkent. Mindez az üzemeltetési és karbantartási költségek növekedésében is hatását érezte.

Mivel a tapasztalt jelenségekre az üzem által folyamatosan mért és ellenőrzött kémiai vizsgálatok eredményei nem adtak magyarázatot (kémiai oxigén igény $< 0,1$ mg/L és vezetőképesség < 1 μ S/cm), a jelenségek magyarázatát az elsődleges, ill. a másodlagos vízkörökben, valamint a vízelőkészítő- és víztisztító rendszerekben feltételezhető mikrobaszaporodás és ennek következtében kialakuló biofilm bevonatok kialakulásában volt feltételezhető. A megoldás érdekében a hűtővízrendszer kritikus pontjait kolonizáló mikrobiális közösségek polifázikus feltérképezését tűztük ki célul a rendszert károsító folyamatokban való szerepük függvényében.

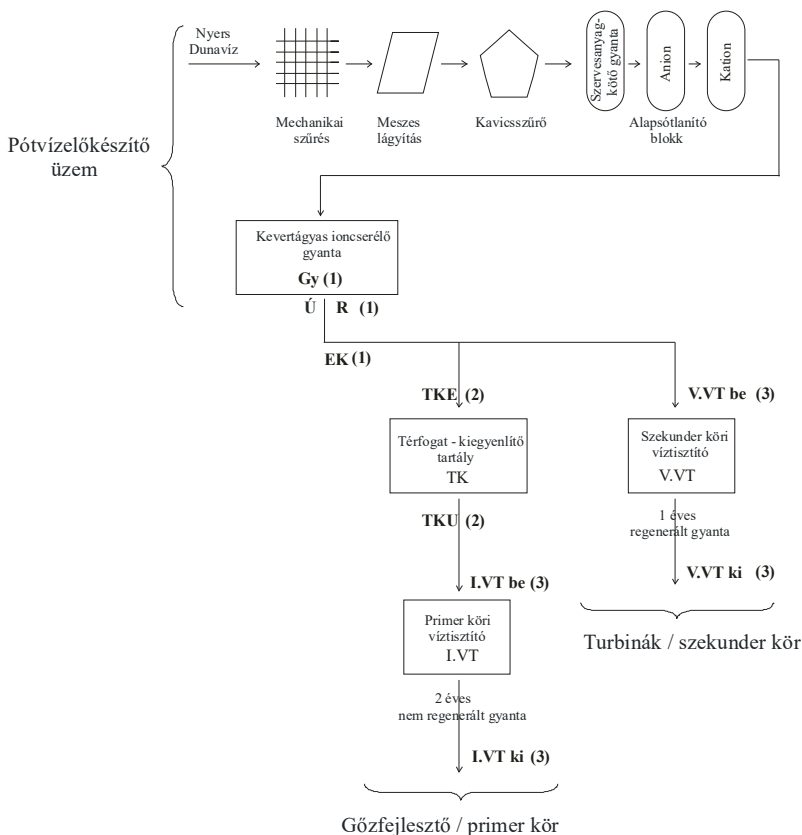
CÉLKITŰZÉSEK

Bár a probléma nem újkeletű, mégis mind a mai napig számos, nagy tisztaságú vizet használó ipari létesítmény küzd a rendszerben található mikrobiális szennyezettség és a mikrobák által kialakított biofilmek megszüntetésével, mely által csökkenthetők a rendszerben fellelhető mikrobiológiai romlások, korróziós folyamatok. A rendszer mikrobiális terheltségének és funkcionális aktivitásuk megismerésével szélesebb horizont nyílna meg a mikrobák eradikálására, de legfőképpen csíraszámuk csökkentésére irányuló védekező mechanizmusok eszköztára felé.

Munkánk során egy, a fenti problémákkal küzdő magyarországi erőmű fő működési egységeiben kialakult mikrobiális közösségek összetételének feltérképezését tűztük ki célul, mely a következő részfeladatokat foglalta magában:

1. Munkánk kezdetén még nem volt képünk a rendszerben fellelhető baktériumok közösségi összetételéről, ezért célunk kettős volt: egyrészt irodalmi adatok alapján kipróbálni / kiválasztani az oligotróf baktériumok tenyésztésére alkalmas táptalajokat, másrészt a lehetőségekhez mérten feltérképezni a pótvízelőkészítőben használt, kimerülőben lévő és újonnan indított kevertágyas ioncserélő gyantáról származó póttápvizek bakteriális közösségi összetételét.
2. A pótvízelőkészítőben a nyersvíz számos tisztítási lépésen esik át, melynek végső lépéseként kevertágyas ioncserélőn való tisztítást alkalmaznak. Innen kerül a nagy tisztaságú víz a gőzfejlesztőre és a turbinákra. A rendszerben tapasztalható mikrobiális kontamináltság feltérképezéséhez fontos a pótvizet előállító gyanta, illetve a gyantáról lejövő víz szállítására használt gumibevonatos szénacélső felületén kialakuló biofilm mikrobiális kontamináltságának megismerése.
3. A dolgozat további részében célunk a gőzfejlesztő (primer kör) és a turbinák (szekunder kör) fő egységei mikrobiális közösség-összetételének feltérképezése volt az alábbi módon:
 - 3.1. A pótvízelőkészítőből származó víz tárolására szolgáló térfogatkiegyenlítő tartálynak (TK tartály), valamint
 - 3.2. a primer (I. VT) és szekunder (V. VT) körű víztisztító rendszerek, azaz a primer- és szekunder körökről lejövő, majd víztisztításon átesett vizek mikrobiális kontamináltságának vizsgálata.

A VIZSGÁLT RENDSZER



2. ábra. A pótvíz előkészítő üzem sematikus vázlata és a mintavételi pontok a 2005-2007 időszakban.

- (1) első mintavétel (2005. 05. 04.): **R**- tisztított víz, kimerülőben lévő gyantáról (a rendszer szétszedése előtt vettvízminta), **Ú**- tisztított víz, frissen indított, regenerált gyantáról, **EK**- a pótvíz-előkészítő rendszer kevertágyas ioncserélő gyantájáról elfolyó, könnyökös fehér lepedékes gumi bevonata, **Gy**- a pótvíz-előkészítőben található, kimerülőben lévő kevertágyas gyantaminta.
- (2) második mintavétel (2006. 06. 18.): **TKE**- térfogat kiegyenlítő (TK) tartály előtti sótalanvíz, **TKU**- térfogat kiegyenlítő (TK) tartály utáni sótalanvíz
- (3) harmadik mintavétel (2007. 03. 08.): **I. VT**- a gőzfejlesztőn keresztüláramló hőhordozó tisztítása a feladata. Nem regenerált, kevertágyas ioncserélő gyantával működik. A mintául szolgáló víz kb. két éves, nem regenerált gyantáról származott: **I. VT be**, **I. VT ki**; **V. VT**- a szekunder körű hőhordozót tisztítja. Mechanikus szűrőből és kevert ágyas ioncserélő gyantából áll. A mintául szolgáló víz kb. egy éve betöltött, regenerált gyantáról származott: **V. VT be**, **V. VT ki**.

A vizsgált erőmű két zárt, egymástól gőzfejlesztővel (felületi hőcserélő) elválasztott körből, az úgynevezett gőzfejlesztőből (primer)- és turbina rendszerből (szekunder kör) állnak. A primer-szekunder rendszerek határoló felületeit a gőzfejlesztők hőátadó csövei jelentik. A hő elszállítására hűtőkörök állnak rendelkezésre, melyek közül az egyikhez kapcsolódik a nyomásssabályozásra alkalmas úgynevezett térfogatkompenzátor vagy nyomáskiegyenlítő tartály (TK). A hőhordozó az ausztenites szerkezetű hőátadó acélcsöveken belül áramlik, a száraz telített gőz fejlesztése a csövek közötti térben megy végbe a szekunder oldalon. A gőzfejlesztő vízszintjének állandó értéken tartása a csőköteg fölé vezetett tápvíz beadással történik. A rendszer további részét képezik a tápvíz-, sóalanvíz- és hűtővíz rendszer is.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mikroszkópia - scanning elektron mikroszkópia (SEM) és epifluoreszcens mikroszkópia

A mikrobaközösségek morfológiai diverzitásának, a biofilm szerveződésének felszíni tanulmányozására alkalmas a pásztázó elektronmikroszkópia (SEM). Mintánkat a csövek megbontása után szabad szemmel is jól látható, termékvezeték könyökcsove (EK) barna gumibevonatának felszínén kialakult biofilmje alkotta. A második (TKE, TKU) és harmadik (I. VT és V. VT be- és kifolyó ági vizei) mintavétel alkalmával lehetőségünk nyílt a heterotróf csíraszámbecslés mellett a minták direkt sejtszámának vizsgálatára is, melyet a preparált mintákon DAPI-val való festés után epifluoreszcens mikroszkópia segítségével végeztünk.

Tenyésztéses vizsgálatok

A víz- és biofilm mintákból tenyésztést végeztünk: a vizekből (Ú, R, TKE, TKU, I. VT ki, V. VT ki) direkt szélesztést és dúsítást végeztünk 3 különböző (R2A, M27 és TSA) táptalajon. A biofilm mintát a mikrobiológia szabályainak megfelelően homogenizálást követően dolgoztuk fel: hígítási sort készítettünk és TSA, R2A, M27 tápagarlemezekre szélesztést végeztünk. A mintákat 5-7 napig 28°C-on inkubáltuk, majd nem szelektív módon baktériumtelepeket izoláltunk és a direkt szélesztéses mintákból heterotróf csíraszámbecslést végeztünk. Az izolátumokat megtisztítottuk. A baktériumtörzseket a

könnyebb kezelhetőség és a korrektebb összehasonlíthatóság miatt közös táptalajon (R2A) tartottuk fenn. A baktériumtörzseket ARDRA-val csoportosítottuk majd a nagyobb csoportok reprezentánsait 16S rDNS szekvencia analízisnek vetettük alá. A GenBank adatbázisban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), illetve az EzTaxon Serveren (<http://www.eztaxon.org.hu>; 2.1 verzió) található szekvenciák közül a törzseink szekvenciájához leginkább hasonlókat BLAST algoritmus segítségével kerestük meg az NCBI Blast programmal.

Az I. VT mintából sikerült korábban még le nem írt baktériumokat is izolálni. A további új fajleírást az alábbi törzsekkel is szeretnénk elvégezni: I/28 és I/32. A kapott szekvenciákat a MEGA 4.0 programcsomag segítségével illesztettük és a szekvenciák filogenetikai viszonyainak ábrázolásához törzsfát hoztunk létre Neighbor-Joining módszer és Kimura-2 paraméter alkalmazásával 1000 ismétléssel.

Molekuláris vizsgálatok – T-RFLP vizsgálat és molekuláris klónozás

Mivel a mikroorganizmusok csak csekély százaléka (0,001-10%) vonható tenyésztésbe, a mintáinkat tenyésztéstől független módszerekkel is feldolgoztuk: a víz (Ú, R, TKE, TKU; I. VT és V. VT be-és kifolyó ági vizei)-, biofilm (EK)- és gyantamintákat (GY) T-RFLP elemzésnek vetettük alá *AluI* (hasítási hely: AG¹CT) és *Hin6I* (G¹CGC) restriktációs enzimek felhasználásával. A T-RFLP elemzés során a szűrővel koncentrált mintákból kapott T-RFLP profilokból a minták diverzitását a különböző hosszúságú fragmentek számából és egymáshoz viszonyított területarányából számoltuk. Ehhez ún. Shannon-Weaver-féle diverzitásindexet alkalmaztuk. A mintákat ABI PrismTM 310 Genetic Analyzer automata készüléken futtattuk. Eredményeinket a T-Align programmal értékeltük. A csúcsok azonosítása a későbbiekben elkészített klónkönyvtár segítségével történt. A kapott T-RFLP profilok alapján a mintákon Syntax 2000 programcsomag segítségével csoportanalízist végeztünk (UPGMA; SM koefficiens).

Az első mintavételből származó T-RFLP vizsgálatok alapján diverz bakteriális közösséget találunk mind a víz (Ú, R), mind a biofilm (EK) és gyanta (GY) minták esetében. Mivel ez alapján az újonnan indított és kimerülőben lévő gyantáról származó vízminta közül a kimerülőben lévő gyantáról származó vízminta (R) bizonyult a legdiverzebbnek, a klónozást és a klónkönyvtár elkészítését ebből a mintából végeztük.

AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEI ÉS KÖVETKEZTETÉSEINK

Legfontosabb eredményeink összefoglalása

1. Bebizonyítottuk, hogy a szerves- és szervetlen tápanyagokat közel kiegyenlített arányban tartalmazó R2A táptalaj bizonyul a rendszerben lévő baktériumok kitenyésztésére alkalmazható legalkalmasabb táptalajnak.
2. A rendszer különböző pontjain (Ú, TKE, I. VT ki), ahol „tisztá vizet” várunk, bár a minták három különböző helyről és három különböző időpontból (sorrendben az első, a második és a harmadik mintavételből, szekvenciálisan közel egy éves mintavételi periódussal) származnak, a kisebb tápanyag-tartalommal jellemezhető táptalajokról (R2A, M27) több izolátum származik és fordítva: a rendszer „koszosabb”, azaz mikrobiálisan terheltebb részéről származó minták (R, EK, TKU, V. VT ki) esetében az oligotrófabb M27 táptalajról kevesebb izolátum származik, mint a tápanyagokban dúsabb R2A vagy TSA táptalajokról.
3. A vízminták direkt szélesztésből származó heterotróf csíraszámuk megfelel a tiszta víz / ivóvíz kategóriának, kivételt képez a TKU minta, ahol közel 40x-es csíraszám értéket tapasztaltunk. A CFU értékek a direkt számolással kapott értékeknél 2 illetve 3 nagyságrenddel kisebbek. A befolyó vizek direkt sejtszám értékei a kifolyó vizek értékeihez képest 1 nagyságrenddel kisebbek, kivéve a TKE-TKU minták esetében, ahol is a nagyságrend változatlan marad a mintákban, de kb. 3x-os sejtszámnövekedés tapasztalható a TKU esetén.
4. Bebizonyítottuk, hogy a nagy tisztaságú vizet használó vizsgált erőmű számos pontja mikrobiálisan erőteljesen szennyezett:
 - 4.1. Már a pótvízelőkészítő rendszer egyes részei- gyanta, gumival bevont szénacél csőrendszer felülete, sótalanvíz- már a pótvíz előállításakor mikrobiálisan terheltek.
 - 4.2. A primer- és szekunder körű rendszerek a rendszerekben lévő speciális paraméterek (magas hőmérséklet, csökkent tápanyagforrás, erős áramlás, stb.) ellenére mikrobiálisan kontamináltak.
5. Kimutattuk, hogy a rendszernek van saját endogén mikrobiótája: vízi baktériumok, melyek forrása pl. a nyersvíz lehet, de szerepet játszhat benne a nyitott rendszer levegővel való érintkezése is.

6. A rendszerből kimutatott szervezetek nagy része aerob, vagy akár anaerob kemolitotróf autotróf, sok közülük hidrogén autotrófiára képes. Ezek jelentősen növelhetik a rendszerben a rendelkezésre álló szerves anyagok mennyiségét, másrészt pedig a felületekhez tapadnak, biofilmet képeznek. Találtunk a vízrendszerben néhány (aerob, vagy anaerob) fotolitotróf autotróf szervezetet is (pl. cianobaktériumok, vagy *Rhodospseudomonas* fajok), melyek passzív túlélők lehetnek.
7. Bebizonyítottuk, hogy a detektált mikroorganizmusok zöme kemoorganokemoheterotróf szervezet. Ezek a rendszerbe az elpusztult mikrobákkal, illetve szerkezeti anyagokkal, valamint technológiai komponensekkel bekerült, valamint az előbb említett autotrófok által megtermelt szerves anyagokat fogyasztják. A zömük aerob, vagy fakultatív anaerob légző szervezet. Obligát anaerob szervezet (akár légző, akár fermentáló) csak nagyon csekély számban mutatható ki. Sok közöttük képes xenobiotikumok, nagyon nehezen mobilizálható szerves anyagok hasznosítására. Metabolikus aktivitásuk révén a rendszer szerkezeti elemeinek (gumival bevont vascsövek, epoxi gyanták, rozsdamenets acél tartály-és csőfelületek) biológiai romlását előidézhetik, abban részt vehetnek.
8. Jellemző a metilotrófok jelenléte is: ú.n. egy-szén-vegyületeket (metanol, hangyasav, formaldehid, metán, metilaminok, metántiolok, vagy komplex szerves anyagok metoxi csoportjai) hasznosítanak, mely tevékenységükkel ezeket az egyébként nem értékesíthető szerves vegyületeket "hasznosíthatóvá alakítják".
9. A nitrogén tekintetében feltehetően nincsen különösebb limitáció a rendszerben: a kimutatott mikrobák egy része képes a légköri nitrogén megkötésére.
10. A rendszerben jelenlévő mikroorganizmusok közvetlenül részt vehetnek a szerkezeti elemek, egyéb rendszerkomponensek rontásában. Kiemelkedő szerep jut e tekintetben a hidrogénfogyasztóknak, amelyek a korróziót serkenthetik, a metilotrófoknak, illetve az aromás komponenseket hasznosítóknak, amelyek a bevonatokat, az ioncserélő gyantákat rongálják.
11. A tudomány számára még ismeretlen, faj-és nemzetség szinten is új baktériumokat izoláltunk; a rendszerből új aktinobaktérium került leírásra: *Aquipuribacter hungaricus* (IV-75⁺-DSM 21674⁺; NCAIM B 02333⁺).
12. A rendszerben végzett mikrobiális közösség-szerkezet feltárása, megismerése további vizsgálatok alapját teremti meg:
 - 12.1. A mikrobák rendszerből való teljes eradikációja lehetetlen feladatnak tűnik, azonban a már szennyezett rendszerben a hatékony csíraszám-csökkentés

megvalósítható: egyrészt a csőrendszerek egy részében mechanikai tisztítási módszerekkel, másutt kémiai szerekkel hatékony lehet a felületeken kialakult depozitok eltávolítása. Nem utolsó sorban megfontolandó a meglévő rendszerek cseréje, különösen ott, ahol az alkalmazott anyagok a mikrobaszaporodást támogatják (pl. gumibevonatok).

12.2. Törekedni kell a megfelelő sejtszámú víz előállítására, akár különböző víztisztítási technológiák kombinálásával.

12.3. További kutatás alapját képezheti a rendszerben alkalmazható mikrobaszaporodást gátló szerek, például biocidek, alkalmazhatóságára irányuló hatástanulmányok: modellrendszer felállítása, majd in situ alkalmazhatósági vizsgálatok elvégzése.

A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Referált tudományos folyóiratokban megjelent cikkek

Bohus, V., Tóth, E. M., Székely, A. J., Makk, J., Baranyi, K., Patek, G., Schunk, J., Márialigeti, K. Microbiological investigation of an industrial ultra pure supply water plant using cultivation-based and cultivation-independent methods. Water Research, 44, 2010, pp. 6124-6132.

E. M. Tóth, Zs. Kéki, **V. Bohus**, A. K. Borsodi, K. Márialigeti and Peter Schumann. *Aquipuribacter hungaricus* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from the ultra-pure water system of a Hungarian power plant International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. April 22, 2011 ijs.0.032672-0. Megjelenés alatt, 2011. április 22.

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

Referált tudományos folyóiratokban megjelent cikkek

Bohus, V., Székely, A., Makk, J., Márialigeti, K., Tóth, E. M. Ultra tiszta vizek bakteriológiai vizsgálata tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független módszerekkel. Hidrológiai Közlöny 87(6), 2007, pp. 58-61.

Konferencia absztraktok

Bohus, V., Tóth, E. M., Székely, A., Makk, J., Márialigeti, K. Bacteriological study of ultra pure water by cultivation based and molecular methods. International Symposium on Environmental Biotechnology ISEB ESEB JSEB Book of Abstracts, 2006, pp. 125.

Veronika Bohus, Anna Székely, Judit Makk, Károly Márialigeti, Erika M. Tóth. Bacteriological diversity of an ultra pure water evaluated by cultivation and cultivation independent methods. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, Akadémiai kiadó, Budapest, 53(3), 2006, pp. 253.

Tóth, E., **Bohus, V.**, Székely, A., Márialigeti, K. Study of microbial communities of high purity water of a power plant based on cultivation and cultivation independent molecular methods. Biospektrum, 2007, pp. 66.

Bohus, V., Szoboszlai, M., Márialigeti, K., Tóth, E.M. Study of the bacterial community of industrial cooling waters by molecular methods. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, Akadémiai Kiadó, Budapest, 54, 2007, pp. 16.

Tóth, E. M., **Bohus, V.**, Makk, J., Székely, A., Márialigeti, K. Microbial community of the high purity water system of a power plant. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, Akadémiai Kiadó, Budapest, 54, 2007, pp. 136.

Fontosabb konferencia előadások

Veronika Bohus, Erika M. Tóth, Anna Székely, Judit Makk, Károly Márialigeti. Bacteriological study of ultra pure water by cultivation based and molecular methods. ISEB, ESEB, JSEB Konferencia, Lipcse, 2006. július 9-14.

Erika M. Tóth, **Veronika Bohus**, Judit Makk, Anna J. Székely, Károly Márialigeti (2007) Microbial community of the high purity water system of a power plant. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2007. június 18-20.

Bohus, V., Szoboszlai M., Márialigeti K., M. Tóth, E. Bacteriological characterisation of three ultra pure cooling water purification tanks by means of cultivation and cultivation independent methods. MMT 2008. évi Nagygyűlése és a XI. Fermentációs Kollokvium, Keszthely, 2008. Október 15-17.

Tóth, E., Szoboszlai, M., **Bohus, V.**, Makk, J., Márialigeti, k. Studies of biofilms formed in ultra pure water pipelines of a power plant. FEMS Conference, Göteborg, Svédország, 2009. június 28 - július 2.